



本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 1月20日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第009171号

出 願 人

Applicant(s):

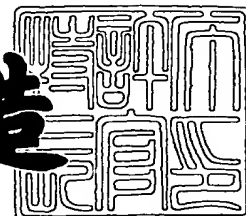
株式会社医学生物学研究所

RECEIVED
NOV 15 2000
TC 1700 MAIL ROOM

2000年 9月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3078119

【書類名】 特許願

【整理番号】 M3-001

【提出日】 平成10年 1月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 アセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の活性検出
方法、並びにこれら酵素の阻害剤もしくは促進剤のスク
リーニング方法

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5-1-1 国立がんセンター研究所
生物部内

【氏名】 田矢 洋一

【発明者】

【住所又は居所】 長野県伊那市大字美篤 7448-374

【氏名】 玉井 克之

【発明者】

【住所又は居所】 長野県伊那市大字伊那 4320 22号

【氏名】 宮崎 敏昭

【特許出願人】

【識別番号】 390004097

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代表者】 数納 幸子

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の活性検出方法、並びにこれら酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検ペプチドのアセチル基転移酵素活性を検出する方法であって、

- (a) 被検ペプチドと基質ペプチドとを接触させる工程、
- (b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、を含む方法。

【請求項2】 アセチル基転移酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 被検化合物の存在下で、アセチル基転移酵素と基質ペプチドとを接触させる工程、
- (b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、
- (c) 被検化合物の非存在下における基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量を低下もしくは増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項3】 被検ペプチドの脱アセチル化酵素活性を検出する方法であって、

- (a) 被検ペプチドとアセチル化された基質ペプチドとを接触させる工程、
- (b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、を含む方法。

【請求項4】 脱アセチル化酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 被検化合物の存在下で、脱アセチル化酵素とアセチル化された基質ペプチドとを接触させる工程、
- (b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、

(c) 被検化合物の非存在下における基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量を増加もしくは低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 5】 基質ペプチドが p53 である、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 基質ペプチドが標識されている、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 標識がビオチンである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 基質ペプチドが固相化されている、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 抗アセチル化ペプチド抗体が標識されている、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出を ELISA 法により行う、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】 請求項 2 または 4 に記載のスクリーニング方法により単離しうる化合物。

【請求項 12】 天然由来である、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】 抗アセチル化ペプチド抗体を含む、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の検出もしくはスクリーニングのためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗アセチル化ペプチド抗体を利用した、アセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出方法、アセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニング方法、並びにこれら検出およびスクリーニングのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

タンパク質は遺伝子の本体である DNA の塩基情報に基づいて合成される（転写

、翻訳)。多くのタンパク質は翻訳後、更に修飾されることによってその活性や機能が調節されることが知られている。現在までに最も研究の進んでいるタンパク質の翻訳後修飾としてリン酸化が挙げられる。細胞内シグナル伝達をつかさどるc-Srcやc-Rafなどの癌遺伝子ファミリータンパク質の多くがリン酸化、脱リン酸化によって調節され、且つ、それらの細胞内シグナル伝達自体がリン酸化、脱リン酸化の連続により行われている (Morrison, D. K., Kaplan, D. R. et al (1989) *Cell* 58, 649-657、Howe, L. R., Leever, S. J. et al (1992) *Cell* 71, 335-342、Kolch, W., Heidecker, G. et al (1993) *Nature* 364, 249-252、Dent, P., Jelinek, T. et al (1995) *Science* 268, 1902-1906)。また、細胞の核内においても多くの転写因子及びそれらの制御タンパク質もリン酸化、脱リン酸化によって細かく調節されていることが知られている (Hill, C. S., Marais, R. et al (1993) *Cell* 73, 395-406、Sanchez, I., Hyghes, R. T. et al (1994) *Nature* 372, 794-798、Akoulitchiev, S., Makela, T. P. et al (1995) *Nature* 377, 447-560、Weinberg, R. A. (1995) *Cell* 81, 323-330)。他の翻訳後修飾として、多くの細胞外タンパク質やレセプターなどの細胞表面タンパク質がグリコシル基などの糖付加を受けることが報告されている (Guan, J. L., Machamer, C. E. and Rose, J. K. (1985) *Cell* 42, 489-496、Sairam, M. R. and Bhargavi, G. N. (1985) *Science* 229, 65-67、Diamond, M. S., Staunton, D. E. et al (1991) *Cell* 65, 961-971、Entwistle, J., Hall, C. L. and Turley, E. A. (1996) *J. Cell. Biochem.* 61, 569-577)。これらの糖付加は細胞外マトリクスや細胞表面レセプターの高次構造の形成及び細胞間認識に重要な働きを持つと考えられている。また、RasなどのGTP結合タンパク質ファミリーなどがファルネシル化やパルミチン酸付加などの脂質修飾されることも知られている (Willumsen, B. M., Christensen, A. et al (1984) *Nature* 310, 583-586、Buss, J. E., Soliski, P. A. et al (1989) *Science* 24, 1600-1603、Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1989) *Nature* 341, 384-385、Vogt, A., Qian, Y. et al (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 660-664)。これらの修飾はタンパク質の細胞膜への局在や他のタンパク質との相互作用に重要なものと考えられている。さらに今までにヒストンのみに報告されていた翻訳後修飾としてアセチル化がある。ヒストン

はDNAに結合している塩基性タンパク質で、DNAと結合してクロマチンの基本構造単位であるヌクレオソームを形成している。このタンパク質は活性化クロマチン部位、即ち、mRNAの転写が盛んに行われている部位では高度にアセチル化され、反対に不活性化クロマチン部位では低アセチル化状態であることが報告されている(Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Crane-Robinson, C. (1988) *EMBO J.* 7, 1395-1402、Wolffe, A. P. (1996) *Nature* 272, 371-372)。現在までに哺乳類細胞においてヒストンにアセチルCoAよりアセチル基を転移する酵素(Histone acetyltransferase: HAT)としてGCN5(Kuo, M. -H., Brownell, J. E. et al (1996) *Nature* 383, 269-272、Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 176-184、Candau, R., Zhou, JX., Allis, C. D. and Berger, S. L. (1997) *EMBO J.* 16, 555-565)、P/CAF(Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996) *Cell* 87, 953-959)、p300/CBP(Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996) *Nature* 384, 641-643、Yang, X. -J., Ogryzko, V. V. et al (1996) *Nature* 382, 319-382)、TAFII250(Mizzen, C. A., Yang, X. -Y. et al (1996) *Cell* 87, 1261-1270)、Tip60(第20回 日本分子生物学会年会 平成9年12月17日 口頭発表 新規なヒストンアセチルトランスフェラーゼTip60 familyの解析 (木村 暁、山本 融、堀越 正美 東大・分生研・発生分化))の5種類が報告されている。また、ヒストンを脱アセチル化する酵素(Histone deacetylase)としてHDAC1/RPD3(Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996) *Science* 272, 408-411、Rundlett, S. E., Carmen, A. A. et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14503-14508)、HDAC2/YY-1BP(Yang, W. -M., Inouye, C., Zeng, Y. Y., Bearss, D., and Seto, E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 12845-12850、Lusser, A., Brosch, G. et al (1997) *Science* 277, 88-91)、HDAC3(Yang, W. -M., Yao, Y. -L., Sun, J. -M., Davie, J. R., and Seto, E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28001-28007)の3つの遺伝子が報告されている。最近、HATとして報告されたp300/CBPがヒストンのみならずp53をアセチル化し、これによりp53の活性が上昇することが報告された(Scolinick, D. M., Chehab, N. H. and et al. (1997) *Cancer Res* 57, 3693-3696、Gu, w., Shi,

X. -L., and Roeder, R. G. (1997) *Nature* 387, 819-823, Lill, N. L., Grossman, S. R. et al (1997) *Nature* 387, 823-827, Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)。p53は癌細胞で特異的に高発現している核内タンパク質として同定され、当初、癌細胞から分離されたp53遺伝子を用いた導入実験などから癌遺伝子と考えられていた。しかしながら癌細胞から分離されたp53遺伝子に変異体であることが判明し、反対に正常p53遺伝子は細胞の増殖抑制、細胞周期停止及び細胞死誘導などの表現型を示すことなどから実際は癌抑制遺伝子であることが明らかになった。p53はDNAの損傷などにより発現誘導され、DNAの特異的配列に結合し転写因子として働くことによって、その癌抑制遺伝子としての機能を示すと考えられている。p53はアセチル化されることによって、その特異的DNA配列への結合能が増強され、その結果、転写活性も上昇する。p53はリン酸化によってもその転写活性が制御されていることが報告されているが、アセチル化によってもp53の転写活性が強く誘導されとの報告がなされたことは、p53の新たな制御機構の存在を示すだけでなく、アセチル化がヒストンだけにとどまらずリン酸化のように細胞全般のタンパク質の機能制御に関与している可能性を示唆している。このため、近年、免疫抑制剤や抗がん剤など新薬開発の標的として、リン酸化、脱リン酸化、脂質修飾に関連する酵素及びその基質となるタンパク質が注目され、これら酵素などに対する阻害剤のスクリーニングが行われている。この現状を鑑みると、今後、アセチル化、脱アセチル化及びその関連タンパク質が新薬開発の新たな標的になることも予想される。すでに今までに酪酸ナトリウム、トリコスタチンA、トラポキシンなどの薬剤がヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として報告されている。これらの阻害剤はそもそも抗真菌抗生物質として又はv-sis-トランスフォーム細胞の形態正常化物質として見いだされ、細胞周期の停止、細胞分化の誘導を起こすことが明らかにされている (Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996) *Science* 272, 408-411, Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17174-17179, Kijima, M., Yoshida, M. and et al (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22429-22435, Chen, W. Y., Bailey, E. C. et al (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5798-5803, Medina, V., Edmonds, B. et al (1997) *Cancer*

r Res. 57, 3697-3707)。その後の研究により、これらの薬剤の標的がヒストン脱アセチル化酵素であることが判明した。このような阻害剤は抗がん剤や抗菌物質としての作用が期待されており、今後、さらに同様の作用を有する物質の探索の一つとしてヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤のスクリーニングが行われるものと考えられる。

【0003】

しかしながら、既存のアセチル基転移酵素活性及び脱アセチル化酵素活性の測定方法は非常に煩雑である。すなわち、アセチル基転移酵素活性を測定するには、細胞より精製したヒストンや合成した基質ペプチドに、アセチル基転移酵素と放射能標識したアセチルCoAを添加しアセチル基転移反応を行う。その後、反応液を一つ一つフィルター上に移し乗せ、洗浄し、液体シンチレーションカウンターを用いて酵素活性の測定を行う必要がある(Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996) Nature 384, 641-643, Mizzen, C. A., Yang, X. -Y. et al (1996) Cell 87, 1261-1270, Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606, Brownell, J. E. and Allis, C. D. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 6364-6368)。また、脱アセチル化酵素活性を測定するには、培養細胞の培地中に、放射能標識された酢酸を添加し、細胞のヒストンを代謝的に放射能標識する。その細胞よりヒストンを精製した後、そのヒストンに脱アセチル化酵素を作用させ脱アセチル化反応を行う。反応後、酢酸エチルを用いて、ヒストンより遊離した放射能標識アセチル基を分離、抽出した後、液体シンチレーションカウンターを用いて酵素活性の測定を行う必要がある(Laherty, C. D., Yang, W. -M. et al (1997) Cell 89, 349-356, Hassig, C., Fleischer, T. C. et al (1997) Cell 89, 341-347, Hendzel, M. J., Delcuve, G. P. and Davie, J. R. (1991) J. Bio. Chem. 266, 21936-21942)。

【0004】

このように、これらの測定系は煩雑ゆえ、多サンプル、多条件での処理は困難であり、新薬開発などのスクリーニングのために簡便な系が求められていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、簡便にアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性を検出する方法、簡便にアセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の阻害剤もしくは促進剤をスクリーニングする方法、並びにこれら検出およびスクリーニングのためのキットを提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、アセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出においてアセチル化されたペプチドに特異的に結合する抗体（抗アセチル化ペプチド抗体）を利用することを想到した。そこで、本発明者らは、抗アセチル化ペプチド抗体を調製し、アセチル基転移酵素による基質ペプチドのアセチル化反応、および脱アセチル化酵素によるアセチル化された基質ペプチドの脱アセチル化反応を行って、これらの反応後に基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出を行った。その結果、本発明者らは、抗アセチル化ペプチド抗体を用いることにより簡便にタンパク質のアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性を検出することができることを見出した。

【0007】

さらに、本発明者らは、この抗アセチル化ペプチド抗体を用いたアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出系を利用することにより、簡便にアセチル基転移酵素及び脱アセチル化酵素に対する阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

【0008】

即ち、本発明は、抗アセチル化ペプチド抗体を利用した、アセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性を検出する方法、アセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の阻害剤もしくは促進剤をスクリーニングする方法に関し、より具体的には、

- (1) 被検ペプチドのアセチル基転移酵素活性を検出する方法であって、
 - (a) 被検ペプチドと基質ペプチドとを接触させる工程、
 - (b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検

出する工程、を含む方法、

(2) アセチル基転移酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で、アセチル基転移酵素と基質ペプチドとを接触させる工程、

(b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、

(c) 被検化合物の非存在下における基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量を低下もしくは増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(3) 被検ペプチドの脱アセチル化酵素活性を検出する方法であって、

(a) 被検ペプチドとアセチル化された基質ペプチドとを接触させる工程、

(b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、を含む方法、

(4) 脱アセチル化酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で、脱アセチル化酵素とアセチル化された基質ペプチドとを接触させる工程、

(b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、

(c) 被検化合物の非存在下における基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量を増加もしくは低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(5) 基質ペプチドがp53である、(1)乃至(4)のいずれかに記載の方法

(6) 基質ペプチドが標識されている、(1)乃至(4)のいずれかに記載の方法、

(7) 標識がビオチンである、(6)に記載の方法、

(8) 基質ペプチドが固相化されている、(1)乃至(4)のいずれかに記載

の方法、

(9) 抗アセチル化ペプチド抗体が標識されている、(1)乃至(4)のいずれかに記載の方法、

(10) 基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出をELISA法により行う、(1)乃至(4)のいずれかに記載の方法、

(11) (2)または(4)に記載のスクリーニング方法により単離しうる化合物、

(12) 天然由来である、(11)に記載の化合物、

(13) 抗アセチル化ペプチド抗体を含む、(1)乃至(4)のいずれかに記載の検出もしくはスクリーニングのためのキット、
に関する。

【0009】

なお、本発明において「ペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合により結合した化合物を指し、その鎖長は問わない。従って、タンパク質もまた本発明における「ペプチド」に含まれる。本発明において「アセチル基転移酵素」とは、アセチル基($\text{CH}_3\text{CO}-$)をある物質(例えば、アセチルCoA)から他の物質に移す反応を触媒する酵素を指す。「脱アセチル化酵素」とは、特定の物質からアセチル基を遊離させる酵素を指す。「抗アセチル化ペプチド抗体」とは、ペプチド上で、アセチル化されたアミノ酸残基を含む抗原決定基(エピトープ)若しくはアセチル化された特定のアミノ酸(例えば、アセチル化されたりジン)に特異的に結合する抗体を指す。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、第一に抗アセチル化ペプチド抗体を利用したアセチル基転移酵素活性の検出方法に関する。本発明のアセチル基転移酵素活性の検出法は、(a)被検ペプチドと基質ペプチドとを接触させる工程、(b)基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、を含む。被検ペプチドとしては、特に制限はない。アセチル基転移酵素活性を検出したい所望のペプチドを用いることができる。また、基質ペプチドとしては、被検ペプチドによ

リアセチル化されることが予想される所望のペプチドを用いることができる。被検ペプチドおよび基質ペプチドは、天然のもの、遺伝子組換え技術を利用して調製されたもの、合成ペプチドのいずれであってもよい。ペプチドの精製を容易にするなどの目的で、他のペプチド（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）と融合されていてもよい。また、公知のペプチドであっても、新規なペプチドであってもよい。公知のアセチル基転移酵素としては、例えば、GCN5(Kuo, M. - H., Brownell, J. E. et al (1996) *Nature* 383, 269-272、Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 176-184、Candau, R., Zhou, JX., Allis, C. D. and Berger, S. L. (1997) *EMBO J.* 16, 555-565)、P/CAF(Ogryzko, V. V., Sciltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996) *Cell* 87, 953-959)、p300/CBP(Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996) *Nature* 384, 641-643、Yang, X. -J., Ogryzko, V. V. et al (1996) *Nature* 382, 319-382、Scolinick, D. M., Chehab, N. H. and et al. (1997) *Cancer Res* 57, 3693-3696、Gu, W., Shi, X. -L., and Roeder, R. G. (1997) *Nature* 387, 819-823、Lill, N. L., Grossman, S. R. et al (1997) *Nature* 387, 823-827、Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)、TAFII250(Mizzen, C. A., Yang, X. -Y. et al (1996) *Cell* 87, 1261-1270)、Tip60（第20回 日本分子生物学会年会 平成9年12月17日 口頭発表 新規なヒストンアセチルトランスフェラーゼTip60 familyの解析（木村 暁、山本 融、堀越 正美 東大・分生研・発生分化））などが、また、アセチル化を受けることが知られているもしくは予想される公知のペプチドとしては、例えば、p53（Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606）、ヒストン（H1, H2A, H2B, H3, H4）（Couppez, M., Ponthieu, A. M. and Sautiere, P. (1987) *J. Bio. Chem.* 262, 2854-2860、Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Robinson, C. C. (1988) *EMBO J.* 7, 1395-1402、Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996) *Cell* 87, 5-8）、TFIIE（Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606）、TFIIF（Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606）、PC4（Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606）などが知られており、これらを用いることも可能である。

【0011】

被検ペプチドと基質ペプチドとの接触は、液相において、また固相において行うことが可能である。液相において接触を行う場合には、基質ペプチドはビオチンなどの標識を有していてもよい。ビオチン標識した基質ペプチドを用いる場合には、被検ペプチドとの接触後、ストレプトアビジン感作した支持体に反応液を添加する（図1参照）。なお、互いに親和性を有するものであれば、アビジン-ビオチン系以外でも本発明に適用することが可能である。一方、固相において接触を行う場合には、固相化した基質ペプチド上で接触反応を行う（図2参照）。接触反応においては、反応系にアセチル基の由来する化合物、例えば、アセチルCoAを添加する。

【0012】

本発明のアセチル基転移酵素活性の検出方法は、基質に結合したアセチル基の検出に抗アセチル化ペプチド抗体を用いることを特徴とする。抗アセチル化ペプチド抗体としては、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。これら抗体は、当業者に公知の方法（例えば、細胞工学 別冊 抗ペプチド抗体実験プロトコール 1994年 秀潤社、Turner, B.M. and Fellows, G. (1989) Eur. J. Biochem. 179, 131-139、Muller, S., Isabey, A. et al. (1987) Molecular Immunology 24, 779-789、Pfeffer, U., Ferrari, N. and Vidali, G. (1986) J. Bio. Chem. 261, 2496-2498参照）により調製することができる。アセチル化された基質ペプチドの検出において、抗アセチル化ペプチド抗体は適宜標識して用いられる。標識としては、検出可能な感度を有すれば特に制限はなく、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、アセチルコリンエステラーゼなどの酵素標識、デルフィニウムなどの蛍光標識、放射標識などを用いることが可能である。また、抗アセチル化ペプチド抗体を標識せずに、抗アセチル化ペプチド抗体と特異的に結合する物質、例えば、二次抗体、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G（AとGの融合タンパク質）などを標識して検出してもよい。基質ペプチドに結合したアセチル基の検出は、上記標識に応じて当業者に公知の方法で行うことができる（例えば、超高感度酵素免疫測定法 石川榮治著 学会出版センター（1993）参照）。その結果

、基質ペプチド上にアセチル基が有意に検出されれば、被検ペプチドはアセチル基転移酵素活性を有すると判定される。

【0013】

また、本発明における抗アセチル化ペプチド抗体は、被検ペプチドのアセチル基転移酵素活性のみならず、脱アセチル化酵素活性の検出に利用することも可能である。従って、本発明は、また、抗アセチル化ペプチド抗体を利用した脱アセチル化酵素活性の検出方法に関する。本発明の脱アセチル化酵素活性の検出方法は、(a) 被検ペプチドとアセチル化された基質ペプチドとを接触させる工程、(b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、を含む。被検ペプチドとしては、特に制限はない。脱アセチル化酵素活性を検出したい所望のペプチドを用いることができる。また、基質ペプチドとしては、被検ペプチドにより脱アセチル化されることが予想される所望のアセチル化されたペプチドを用いることができる。被検ペプチドおよび基質ペプチドは、天然のもの、遺伝子組換え技術を利用して調製されたもの、合成ペプチドのいずれであってもよい。ペプチドの精製を容易にするなどの目的で、他のペプチド（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）と融合されていてもよい。また、公知のペプチドであっても、新規なペプチドであってもよい。公知の脱アセチル化酵素としては、例えば、HDAC1/RPD3 (Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996) *Science* 272, 408-411、Rundlett, S. E., Carmen, A. A. et al (1996) *Proc. Natl. Ac ad. Sci. USA.* 93, 14503-14508)、HDAC 2/YY-1BP (Yang, W. -M., Inouye, C., Zeng, Y. Y., Bearss, D., and Seto, E. (1996) *Proc. Natl. Ac ad. Sci. USA.* 93, 12845-12850、Lusser, A., Brosch, G. et al (1997) *Science* 277, 88-91)、HDAC3 (Yang, W. -M., Yao, Y. -L., Sun, J. -M., Davie, J. R., and Seto, E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28001-28007)などが挙げられる。また、脱アセチル化を受けることが知られているもしくは予想される公知のペプチドとしては、例えば、p53 (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)、ヒストン (H1, H2A, H2B, H3, H4) (Coupepez, M., Ponthieu, A. M. and Sautiere, P. (1987) *J. Bio. Chem.* 262, 2854-2860、Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Robinson, C. C. (1988) *EMBO J.*

7,1395-1402、Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996) Cell 87, 5-8)、TFIIE (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606)、TFIIF (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606)、PC4 (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606) などが挙げられる。被検ペプチドとアセチル化された基質ペプチドとの接触、および基質ペプチド上のアセチル基の検出は、上記のアセチル基転移酵素活性の検出方法と同様に行うことができる(但し、接触反応の反応系にアセチル基の由来する化合物を添加する必要はない。図3、図4参照)。その結果、基質ペプチド上のアセチル基の減少が有意に検出されれば、被検ペプチドは脱アセチル化酵素活性を有すると判定される。

【0014】

これらアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出系は、それぞれアセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングに利用することができる。従って、本発明は、また、アセチル基転移酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法および脱アセチル化酵素の活性を阻害する化合物のスクリーニング方法に関する。

【0015】

本発明のアセチル基転移酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で、アセチル基転移酵素と基質ペプチドとを接触させる工程、(b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、(c) 被検化合物の非存在下における基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量(対照)と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量を低下もしくは増加させる化合物を選択する工程、を含む。このスクリーニング方法において用いられる被検化合物としては、例えば、ペプチド(タンパク質を含む)、合成低分子化合物、動植物や細菌の細胞抽出物、細胞培養上清などが用いられるが、これらに制限されない。また、アセチル基転移酵素としては、例えば、GCN5(Kuo, M. -H., Brownell, J. E. et al (1996) Nature 383, 269-272、Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996) Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 176-184、Candau, R., Zhou, JX., Allis, C. D. and Berger, S. L. (1997) EMBO J. 16, 555-565)、P/CAF(Ogryzko, V. V., Sc

iltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996) Cell 87, 953-959)、p300/CBP(Bannister, A. J., and Kouzarides. T. (1996) Nature 384, 641-643、Yang, X. -J., Ogryzko, V. V. et al (1996) Nature 382, 319-382、Scolinick, D. M., Chehab, N. H. and et al. (1997) Cancer Res 57, 3693-3696、Gu, w., Shi, X. -L., and Roeder, R. G. (1997) Nature 387, 819-823、Lill, N. L., Grossman, S. R. et al (1997) Nature 387, 823-827、Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606)、TAFII250(Mizzen, C. A., Yang, X. -Y. et al (1996) Cell 87, 1261-1270)、Tip60 (第20回 日本分子生物学会年会 平成9年12月17日 口頭発表 新規なヒストンアセチルトランスフェラーゼTip60 familyの解析 (木村 暁、山本 融、堀越 正美 東大・分生研・発生分化)) などが、基質ペプチドとしては、例えば、p53 (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606)、ヒストン (H1, H2A, H2B, H3, H4) (Couppez, M., Ponthieu, A. M. and Sautiere, P. (1987) J. Bio. Chem. 262, 2854-2860、Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Robinson, C. C. (1988) EMBO J. 7, 1395-1402、Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996) Cell 87, 5-8)、TFIIE (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606)、TFIIF (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606)、PC4 (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) Cell 90, 595-606) などが用いられるが、これらに制限されない。被検ペプチドと基質ペプチドとの接触、および基質ペプチド上のアセチル基の検出は、上記のアセチル基転移酵素活性の検出方法と同様に行うことができる。その結果、被検化合物の非存在下で基質ペプチドに結合しているアセチル基を検出した場合 (対照) と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量が低下すれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、アセチル基転移酵素の活性を阻害すると判定される。逆に、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量が増加すれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、アセチル基転移酵素の活性を促進すると判定される。なお、被検化合物として、動植物や細菌の細胞抽出物、細胞培養上清などを用いた場合には、当業者に公知の方法 (例えば、各種クロマトグラフィー) によりこれらを分画して、それぞれ検出を行うことにより、アセチル基転移酵素の活性を阻害もしくは促進する単一の化合物を最終的に特定

することが可能である。

【0016】

一方、本発明の脱アセチル化酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で、脱アセチル化酵素とアセチル化された基質ペプチドとを接触させる工程、(b) 基質ペプチドに結合しているアセチル基を抗アセチル化ペプチド抗体で検出する工程、(c) 被検化合物の非存在下における基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量(対照)と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量を増加もしくは低下させる化合物を選択する工程、を含む。このスクリーニング方法において用いられる被検化合物としては、例えば、ペプチド(タンパク質を含む)、合成低分子化合物、動植物や細菌の細胞抽出物、細胞培養上清などが用いられるが、これらに制限されない。また、脱アセチル化酵素としては、例えば、HDAC1/RPD3 (Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996) *Science* 272, 408-411, Rundlett, S. E., Carmen, A. A. et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14503-14508)、HDAC2/YY-1BP (Yang, W. -M., Inouye, C., Zeng, Y. Y., Bearss, D., and Seto, E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12845-12850, Lusser, A., Brosch, G. et al (1997) *Science* 277, 88-91)、HDAC3 (Yang, W. -M., Yao, Y. -L., Sun, J. -M., Davie, J. R., and Seto, E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28001-28007)などが、また、基質ペプチドとしては、例えば、p53 (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)、ヒストン(H1, H2A, H2B, H3, H4) (Couppez, M., Ponthieu, A. M. and Sautiere, P. (1987) *J. Bio. Chem.* 262, 2854-2860, Hebbes, T. R., Thorne, A. W. and Robinson, C. C. (1988) *EMBO J.* 7, 1395-1402, Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996) *Cell* 87, 5-8)、TFIIE (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)、TFIIF (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)、PC4 (Gu, W. and Roeder, R. G. (1997) *Cell* 90, 595-606)などが用いられるが、これらに制限されない。被検ペプチドとアセチル化された基質ペプチドとの接触、および基質ペプチド上のアセチル基の検出は、上記の脱アセチル化酵素活性の検出方法と同様に行うことができる。その結果、被検化合物の非存在下で基質ペ

プチドに結合しているアセチル基を検出した場合（対照）と比較して、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量が増加していれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、脱アセチル化酵素の活性を阻害すると判定される。逆に、基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出量が低下していれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、脱アセチル化酵素の活性を促進すると判定される。なお、被検化合物として、動植物や細菌の細胞抽出物、細胞培養上清などを用いた場合には、当業者に公知の方法（例えば、各種クロマトグラフィー）によりこれらを分画して、それぞれ検出を行うことにより、脱アセチル化酵素の活性を阻害する単一の化合物を最終的に特定することが可能である。これらスクリーニングにより単離されたアセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物は、特に、癌治療薬や抗真菌抗生物質の候補化合物として有用である。

【0017】

なお、基質ペプチドのアセチル化および脱アセチル化の検出に関しては、酵素によるアセチル化、脱アセチル化のみならず、非酵素的なアセチル化、脱アセチル化についても報告されている。例えば、シクロオキシゲナーゼはアラキドン酸からプロスタグランジンやトロンボキサンを合成する初発酵素であり、その活性部位近傍に位置する530番目のセリン残基がアスピリンによってアセチル化されて酵素反応が阻害されることが報告されている（参考文献；Patrono, C. et al. (1989) *Trend. Pharmacol. Sci.* 10, 453-458）。従って、本発明の検出法は、タンパク質のアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出のみならず、合成低分子化合物などを含む種々の化合物のアセチル化活性および脱アセチル化活性の検出に用いることも可能である。さらに、これら化合物のアセチル化活性および脱アセチル化活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングを行うことも可能である。

【0018】

また、本発明は、上記アセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出並びにこれら酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングに用いる、抗アセチル化ペプチド抗体を含むキットに関する。本発明のキットは、

アセチル基転移酵素活性の検出に用いる場合には、抗アセチル化ペプチド抗体以外に、例えば、アセチル基転移酵素、基質ペプチド、および／または緩衝液を含んでいてもよい。また、脱アセチル化酵素活性の検出に用いる場合には、抗アセチル化ペプチド抗体以外に、脱アセチル化酵素、アセチル化された基質ペプチド、および／または緩衝液を含んでいてもよい。これら酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングに用いる場合には、さらに被検化合物を含んでいてもよい。基質ペプチドおよび抗アセチル化ペプチド抗体は、上記した標識がなされていてもよい。酵素標品、基質ペプチド標品、抗アセチル化ペプチド抗体標品には、タンパク質の安定化などのための他の成分が含まれていてもよい。例えば、1%程度のBSA、および終濃度0.2~10%（好ましくは1%）のシュークローズ、フルクトースなどのポリオール類を標品中に添加し、凍結乾燥後のタンパク質変性防止剤として用いることが好ましい。また、アセチル基転移酵素活性の検出または該酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングに用いる緩衝液としては、例えば、実施例に記載の「50 mM Tris-HCl pH8.0, 10% グリセロール, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM 酪酸ナトリウム, 200 nM アセチル-CoA」を、脱アセチル化酵素活性の検出または該酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングに用いる緩衝液としては、例えば、実施例に記載の「10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 150mM NaCl」を用いることができる。

【0019】

【実施例】

以下、実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に制限されるものではない。

【0020】

[実施例1] 抗アセチル化抗体の調製

1. 免疫原の作製

(1) ペプチドの作製

アセチル化サイトとして報告されたヒトp53のアミノ酸373番目と382番目のリジン残基をそれぞれ含む以下の4本のペプチド、「Ac p53-1」（配列番号：1/S TSRHKK(Ac)LMFKTEC)、「p53-1」（配列番号：2/STSRHKKLMFKTEC)、「Ac p53

-2」 (配列番号: 3 / SHLKSKK(Ac)GQSTSRC)、および「p53-2」 (配列番号: 4 / SHLKSKKGQSTSRC) をペプチド合成機を用いて作製した。なお、アミノ酸は一文字表記である。また、K(Ac)は アセチル化リジン残基を示す。合成したペプチドは90%以上の純度であることがHPLCにより確認された。「Ac p53-1」と「p53-1」はヒトp53の376番目から388番目までの、「Ac p53-2」と「p53-2」は367番目から379番目までのアミノ酸からなる。全てのペプチドのカルボキシ末端最後尾のシステイン残基は、ペプチドのキャリアータンパク質への結合のために導入したものである。

【0021】

(2) ペプチドのキャリアータンパク質への結合

免疫原とするため、アセチル化ペプチド (「Ac p53-1」と「Ac p53-2」) をそれぞれキャリアータンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) (KLH) と共有結合させた。これらのペプチドとKLHの結合には m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を架橋物質として用いた。等量のKLHとペプチドが架橋された。このペプチド-KLHを免疫原として使用した。

【0022】

2. 免疫及び採血

(1) 免疫方法と抗体力価の確認

キャリアータンパク質KLHとそれに結合したペプチド (ペプチド-KLH) 200ug (100ul) をウサギの1回あたりの免疫原として用いた。1.5mlチューブで、等量のフロイト完全アジュバントとペプチド-KLH (各100ul) を1mlシリンジと21ゲージ注射針を用いて、完全にエマルジョン化するまで混合した。このペプチド-KLHとアジュバントのエマルジョンをウサギ (Japanese white) の背後部皮下に4から5ヶ所に分け、26ゲージ注射針を使用して注射した (免疫)。免疫は1週間ごとに1回、合計5回行った。5回目の免疫の際、抗体力価を検定するため、ウサギの耳朶静脈より数ml採血し、ELISA法により抗体力価の確認を行った。

【0023】

(2) 本採血

十分な抗体力価の確認後、翌週より1週間ごと採血、休息、免疫の計3週間を1サイクルとして、それを4回繰り返した。採血は抗体力価の確認の際と同様に、耳朶静脈より行われた。1回の採血あたり、おおよそ60~70mlの血液を採取した。5サイクル目の採血において、カテーテルを用いて心臓より可能なかぎりの血液を回収した。

【0024】

(3) 血清の回収、保存及び抗体分画の分離

採取した血液を4℃に一晩静置し凝固させ、血清を分離した。分離回収された血清に終濃度0.1%になるようアジ化ナトリウムを添加し、4℃で保存した。抗体分画を分離、濃縮するため、回収した血清に終濃度50%になるように硫酸を添加し、30℃で一時間以上、攪拌した。高速遠心によりその沈殿を回収した。最小限の純水で沈殿を完全に溶解後、透析膜を用いてPBSに対して透析した。完全にPBSに平衡化した後、この抗体分画をカラムにかけ、抗体の精製を行った。

【0025】

3. 特異化抗体の精製

(1) 特異化カラム及び吸収用カラムの作製

5~10mlの0.1M炭酸バッファー中で1~2gのCNBr活性化セファロース4Bとペプチド1mgをローテーターを用いて、4℃、0/Nで混和することによって、セファロース4Bにペプチドを結合させた。翌日、セファロース4Bをカラムに充填し、カラム体積の4~10倍量のPBSでセファロース4Bを洗浄した。洗浄後、1M Tris-HCl(pH7.0)でカラムを平衡化し、セファロース4B表面に残っている活性基をブロッキングするため、そのまま1時間以上30℃に放置した。ブロッキング後、PBSで洗浄、平衡化し使用した。

【0026】

(2) 特異化カラム及び吸収用カラムによる抗 Ac化ペプチド抗体の精製

抗アセチル化ペプチド特異抗体を精製するため、抗「Ac p53-1」、抗「Ac p53-2」抗体分画はそれぞれの特異化カラムに通した。PBS-0.1% Tween 20 で洗浄後、カラムに吸着している抗アセチル化ペプチド抗体を0.1M グリシン-HCl (pH3.0)で溶出した。特異化カラムより溶出された抗体分画は吸収用カラムに通した。

抗「Ac p53-1」抗体分画を「p53-1」セファロース4Bカラムに、抗「Ac p53-2」抗体分画を「p53-2」セファロース4Bカラムにそれぞれ通した。それらのカラムに通すことによって アセチル化ペプチドに特異的でなく、非アセチル化ペプチドとともに反応する抗体を、それらのカラムに吸収させた。抗アセチル化ペプチド特異抗体はカラムに吸着せず、カラムを素通りする。それぞれの抗体分画を通した後、吸収用カラムはPBS-0.1%Tween 20で洗浄し、カラムに吸着している抗非アセチル化ペプチド抗体を0.1M グリシン-HCl(pH3.0) で溶出した。溶出後、カラムは再びPBS-0.1%Tween 20で平衡化した。抗体分画は非アセチル化ペプチド抗体が完全に吸収されるまで、数回吸収用カラムに通した。吸収の進み具合は非アセチル化ペプチド感作プレートを用いたELISAによって確認した。吸収用カラムで完全に抗非アセチル化ペプチド抗体を吸収した抗「Ac p53-1」抗体分画は「Ac p53-2」セファロース4Bカラムに、抗「Ac p53-2」抗体分画は「Ac p53-1」セファロース4Bカラムにそれぞれ通した。この処理により、未だ抗体分画に含まれていると考えられるアセチル化リジン残基特異抗体を吸収した。この吸収の進み具合は、アセチル化ペプチド感作プレートを用いたELISAによって確認された。吸収用カラムで完全に吸収した抗体（抗アセチル化ペプチド特異的抗体）をPBSに対して透析した後、アセチル化ペプチド感作プレートを用いたELISAによって、そのアセチル化ペプチドに対する特異性を最終的に確認した。

【0027】

(3) 抗体力価及び抗体の特異化検定用ELISAプレートの作製及び使用

ペプチドを10 ug/mlになるようにPBSに溶かし、ELISA用マイクロタイタープレートに1ウェルあたり50 ulずつ分注して、4℃で 0/N 感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、1% BSA-0.1% Tween 20-PBSを1ウェルあたり200 ulずつ分注して、30℃、1時間以上ブロッキングをおこなった。アセチル化ペプチド（「Ac p53-1」、「Ac p53-2」）感作プレートは抗体力価の測定、抗アセチル化リジン残基特異抗体の吸収、抗アセチル化ペプチド抗体の特異性の確認に用いられた。また、非アセチル化ペプチド（「p53-1」、「p53-2」）感作プレートはカラムによる非特異抗体の吸収の確認に用いられた。血清や抗体を0.1% Tween 20-PBSで必要に応じて希釈した。希釈したそれらのサンプルを感作プレート1ウェルあたり1

00ul添加し、30℃、1時間、静置した（一次反応）。一次反応後、洗浄瓶を用いて、各ウェルを0.1% Tween 20-PBSで4回以上、十分に洗浄した。0.1% Tween 20-PBSで3000倍希釈したヤギ抗ウサギIgG(H+L) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体(MBL 458)を各ウェルに100ulずつ分注し、30℃で1時間、静置した（二次反応）。二次反応後、同様に、0.1% Tween 20-PBSで洗浄した後、750uM TMB(テトラメチルベンジジン)溶液を1ウェルあたり100ul添加し、30℃で5～20分間発色させた（発色反応）。1.5Nリン酸溶液を100ulずつ加え発色反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450nmにおける吸光度を測定した。

【0028】

(4) 特異性の確認

抗「Ac p53-1」特異抗体及び抗「Ac p53-2」特異抗体を、それぞれ0.01～1.0ug/mlに希釈し、各ペプチド感作プレートを用いてそれらの特異性を確認した(図5、図6)。その結果、各抗体のそれぞれのアセチル化ペプチドに対しての反応は、認められたが、もう一方のアセチル化ペプチドや非アセチル化ペプチドに対する反応は、ほぼ認められなかった。また、0.5 ug/mlに希釈した抗体に0～50ug/mlで各アセチル化ペプチド及び非アセチル化ペプチドを添加し、室温で1時間結合させた後、各アセチル化ペプチド感作プレートを用いて競合阻止試験を行った(図7、図8)。その結果、それぞれのアセチル化ペプチドにより、特異的に、それらの抗体の反応が阻害された。以上の結果より、精製された抗体はアセチル化ペプチドのみに特異性を持つことが確認された。

【0029】

〔実施例2〕 遺伝子組換えによるアセチル基転移酵素及び脱アセチル化酵素の作製

1. PCR による遺伝子の単離

(1) アセチル基転移酵素遺伝子

現在までに哺乳類のヒストン、P53のアセチル基転移酵素としてP300/CBP、Gcn5、TAFII250、P/CAF、Tip60の5つ遺伝子が報告されている。このうちP300とCBPは異なる遺伝子であるが、これらの塩基配列及びアミノ酸配列には非常に高い相溶性が認められている。これらアセチル基転移酵素のうち、P300/CBPとGcn5をPC

R法を用いて増幅、単離した。以下の PCR用プライマーを作製した。P300/CBP増幅用プライマーとしては、フォワードプライマー「CBPF」（配列番号：5′/5′-GCGGATCCCAGAATAGGTATCATTCTGTGAG-3′（5′側3つの塩基（GCG）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5′側4番目から9番目（GGATCC）は制限酵素BamHIサイト）およびリバースプライマー「CBPR」（配列番号：6′/5′-AGACTCGAGCTTGCACTCGTTGCAGGTGTAGAC-3′（5′側3つの塩基（AGA）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5′側4番目から9番目（CTCGAG）は制限酵素XhoIサイト）を用いた。このプライマーセットを用いることによって、アセチル基転移酵素活性部位と報告されているP300のアミノ酸1195番目から1673番目を、CBPの1231番目から1710番目をコードしているDNAをPCRにより増幅した。また、Gcn5増幅用プライマーとしては、フォワードプライマー「Gcn5F」（配列番号：7′/5′-TATGGATCCATGCTGGAGGAGGAGATCTATG-3′（5′側3つの塩基（TAT）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5′側4番目から9番目（GGATCC）は制限酵素BamHIサイト。）およびリバースプライマー「Gcn5R」（配列番号：8′/5′-TATCTCGAGCTTGTCATGAGGCCTCCCTCC-3′（5′側3つの塩基（TAT）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5′側4番目から9番目（CTCGAG）は制限酵素XhoIサイト）を用いた。このプライマーセットを用いることによって、Gcn5のアミノ酸1番目から476番目（全長）をコードしているDNAをPCRにより増幅した。

【0030】

(2) 脱アセチル化酵素遺伝子

現在までにのHDAC1/RPD3、HDAC2/YY-1BP、HDAC3の3つの遺伝子が脱アセチル化酵素として報告されている。これら脱アセチル化酵素遺伝子のうち、HDAC1/RPD3、HDAC3をPCR法を用いて増幅、単離した。以下のPCR用プライマーを作製した。HDAC1/RPD3増幅用プライマーとしてはフォワードプライマー「HD1F」（配列番号：9′/5′-CGCGGATCCATGGCGCAGACGCAGGGCACC-3′（5′側3つの塩基（CGC）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5′側4番目から9番目（GGATCC）は制限酵素BamHIサイト）およびリバースプライマー「HD1R」（配列番号：10′/5′-CGCCTCAGGGCCAACTTGACCTCCTCCTT-3′（5′側3つの塩基（CGC）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5′側4番目から9番目（CTCGAG）は制限酵素XhoIサイト）を用

いた。このプライマーセットを用いることによって、HDAC1/RPD3の1番目から482番目（全長）をコードしているDNAを増幅した。HDAC3増幅用プライマーとしては、フォワードプライマー「HD3F」（配列番号：11／5'-CGCGGATCCATGGCCAAGACCGTGGCGTAT-3'（5'側3つの塩基（CGC）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5'側4番目から9番目（GGATCC）は制限酵素BamHIサイト）およびリバースプライマー「HD3R」（配列番号：12／5'-CGCCTCGAGAATCTCCACATCGCTTTCCTT-3'（5'側3つの塩基（CGC）は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5'側4番目から9番目（CTCGAG）は制限酵素XhoIサイト）を用いた。この2つのプライマーセットを用いることによってHDAC3のアミノ酸1番目から428番目（全長）をコードしているDNAを増幅した。

【0031】

(3) PCR の条件

アセチル基転移酵素遺伝子、脱アセチル化酵素遺伝子をPCR法で増幅する際のテンプレートとして、ヒト子宮頸ガン由来HeLa細胞のcDNAを用いた。まず、cDNAを作製するため、HeLa細胞よりフェノール-チオシアン酸グアニジン法（ニッポンジーン、ISOGEN）を用いて全RNAを抽出、精製した。抽出した全RNAをもとにランダムプライマーを用いてcDNAを合成した（逆転写反応）。PCR反応は、1) 92℃3分間を1サイクル、2) 92℃1分間（変性）、下記の温度1分間（アニーリング）、72℃1分間（伸長）を35サイクル、3) 72℃10分を1サイクル以上の条件を基本におこなった。

【0032】

アニーリングの温度は下記のように、各遺伝子のプライマーセットで異なった設定値を用いた。即ち、プライマーセット「CBPF-CBPR」では55℃、「Gcn5F-Gcn5R」では66℃、「HD1F-HD1R」では64℃、「HD3F-HD3R」では64℃である。また、これらPCRの耐性DNAポリメラーゼとしてTaqポリメラーゼを用いた。

【0033】

2. PCR産物の発現ベクターへのサブクローニング

(1) PCR産物の精製

PCRによって増幅された各DNAバンド（PCR産物）は1%のアガロースゲル電気泳

動によって確認した。バンドの確認後、各PCR産物を制限酵素BamHIとXhoIによって処理した。この処理によって、PCRの各プライマーの5'末端側に導入しておいた制限酵素サイトが切断され、PCR産物の両末端は付着末端となる。制限酵素処理された各PCR産物はアガロースゲル電気泳動によって分離した。アガロースゲルで分離されたPCR産物のバンドをゲルごと切り出し、グラスミルク (glass milk) を用いてアガロースから分離精製した。

【0034】

(2) 発現ベクターへのライゲーション

アガロースゲルから分離精製されたPCR産物は、発現ベクターpGEX及びpETのクローニングサイトにサブクローニングした。発現ベクターは前もってPCR産物の両末端と同じ制限酵素BamHIとXhoIによって処理した後、アガロースゲルで分離精製しておいた。PCR産物と発現ベクターをほぼ等モルになるように混和し、T4ライゲースを用いてライゲーションした。ライゲーションは16℃、1時間おこなった。

【0035】

(3) 大腸菌へのトランスフォーメーション

ライゲーション後、各サンプルは塩化ルビジウム法によってコンピテント化された大腸菌 DH5 α に導入された (トランスフォーメーション)。100ulのコンピテントDH5 α とライゲーションした各サンプル10ulを1.5 mlチューブ内で穏やかに混和し、氷上に30分間静置した。チューブを素早く42℃温水中に移し、30秒間ヒートショックした後、再び氷上に戻し、数分間静置した。1.0mlのSOC培地を各チューブに加え、37℃、1時間放置した。これを発現ベクターpGEX及びpETのセレクション用の抗生物質であるアンピシリンを50ug/mlで含むLBプレートにスプレッドした。それらのプレートは37℃、O/N培養した。

【0036】

3. 大腸菌からの組み換えタンパク質の精製

(1) インサート及びそのシーケンスの確認

プレートから複数のコロニーを拾い、LB-アンピシリン培地で一晚培養した。培養した大腸菌から、アルカリ法を用いてプラスミド (発現ベクター) を精製し

た。それらプラスミドを制限酵素BamHIとXhoIで処理し、アガロースゲル電気泳動によりインサート（PCR産物）が入っていることを確認した。また、それらプラスミドのインサートの塩基配列をサンガー法にもとずき、オートシーケンサーを用いて正しいことを確認した。

【0037】

(2) pGEXベクターでの組換えタンパク質の発現と精製

正確なプラスミドを持った大腸菌（DH5 α ）をLB-アンピシリン培地で一晚培養した。一晚培養された培養液の一部を取り、LB-アンピシリン培地に数十倍希釈になるよう添加し、600nmで菌液の濁度を随時測定しながら、数時間、37℃で振とう培養した。濁度が0.6～1.0になった時点で、組み換えタンパク質を発現誘導するため培養液中にIPTGを終濃度1mMになるよう添加し、さらに、4時間培養を続けた。その後、培養液から遠心により菌体を回収した。回収された菌体の一部を用いてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）をおこなった。泳動後、ゲルをクマシーブルーで染色して発現誘導された組み換えタンパク質のバンドを確認した。pGEXベクターでは組み換えタンパク質はグルタチオン-s-トランスフェラーゼ（GST）とのフュージョンタンパク質として作られる。この還元型GSTがグルタチオン（GSH）に対して非常に高いアフィニティーを持っていることを利用して、組換えタンパク質の精製をおこなった。組み換えタンパク質の発現を確認した後、その菌体を1% Tween 20 - PBS によく懸濁した後、ソニケーションにより菌体を破碎した。高速遠心により、組換えタンパク質を含む可溶性分画を分取した。この可溶性分画をGSH-セファロース4Bカラムに通し、GSTとのフュージョンである組み換えタンパク質をカラムに吸着させた。カラムをGバッファー（10mM GSH, 50mM Tris-HCl pH9.6）で十分に洗浄した後、組換えタンパク質をWEバッファー（10mM 2-メルカプトエタノール, 2mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl pH7.5）を用いて溶出した。

【0038】

(3) pETベクターでの組換えタンパク質の発現と精製

pETベクターでの組み換えタンパク質の発現は、T7 RNAポリメラーゼによって誘導される。このため発現プラスミドを、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を持つ大腸

菌BL21(DE3)にトランスフォーメーションした。このBL21(DE3)のT7 RNAポリメラーゼはIPTGによって発現誘導されるので、pGEXベクターと同様に、IPTGを培養に添加することによって組み換えタンパクの発現誘導をおこなった。誘導後、pGEXの場合と同様に、培養液から遠心により菌体を回収し、その一部を用いて SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)をおこなった。泳動後、ゲルをクマシーブルーで染色して発現誘導された組み換えタンパク質のバンドを確認した。pETベクターでは連続した6つのヒスチジン (6His-Tag) が組み換えタンパク質の両末端に付加される。この6His-Tagがニッケルと錯体を形成することを利用して、組み換えタンパク質の精製をおこなった。組み換えタンパク質の発現を確認した後、その菌体をバインディングバッファー (Binding buffer) (5 mM イミダゾール, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.0, 0.1% NP-40) によく懸濁した後、ソニケーションにより菌体を破碎した。高速遠心し、その上清より組み換えタンパク質を含む可溶性分画を分取した。この可溶性分画を Ni-NTA-アガロースカラムに load し、6His-Tag を介して組換えタンパク質をカラムに吸着させた。カラムをバインディングバッファー (Binding buffer) で十分に洗浄した後、更に洗浄バッファー (10mM イミダゾール, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.9) で洗浄した。組み換えタンパク質は溶出バッファー (50mMから1Mイミダゾール, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.9) を用いて溶出した (イミダゾールの濃度を50mM, 100mM, 200mM, 1Mと濃度を徐々に上げながらおこなった)。

【0039】

[実施例3] アセチル基転移酵素の活性測定系

1. アセチル基転移酵素活性測定用ELISA系の構築

(1) 基質ペプチド及び組換えp53-C terタンパク質の作製

アセチル基転移酵素のアセチル化サイトとして報告されたヒトp53のアミノ酸373番目と382番目のリジン残基をそれぞれ含む2つの基質ペプチド「Sub p53-1」(配列番号: 13/Bio-STSRHKKLMFKTE) および「Sub p53-2」(配列番号: 14/Bio-SHLKSKKGQSTSR) を、ペプチド合成機を用いて作製した。なお、ペプチド中のアミノ酸は一文字表記した。また、アミノ末端の「Bio」はビオチンを示す。90%以上の純度であることをHPLCにより確認した。「Sub p53-1」はヒトp53の3

76番目から388番目までの、「Sub p53-2」は367番目から379番目までのアミノ酸からなる。また、p53のカルボキシ末端110アミノ酸（284番目から391番目）の遺伝情報を持つDNAをプライマーセット「p53cF」（配列番号：15／5'-TATGGATCCACAGAGGAAGAGAATCTCCGC-3'（5'側3つの塩基(TAT)は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5'側4番目から9番目(GGATCC)は制限酵素BamHIサイト）および「p53cR」（配列番号：16／5'-TATCTCGAGGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGA-3'（5'側3つの塩基(TAT)は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTCGAG)は制限酵素XhoIサイト）を用いてPCR法により増幅した。増幅したPCR産物をpGEXにサブクローニングし、GSTとのフュージョンとして発現させ、精製した（GST-p53 Cter）。

【0040】

(2) 基質ペプチド、「GST-p53 Cter」、及びストレプトアビジン感作プレートの作製

2つの基質ペプチドをそれぞれ10ug/mlになるようにPBSに溶かし、それぞれのペプチド溶液をELISA用マイクロタイタープレートウェルあたり、50ulづつ分注して、4℃、0/N、感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、1% BSA-0.1% Tween 20-PBSを1ウェルあたり200ulづつ分注して、30℃、1時間以上ブロッキングをした。「GST-p53 C ter」、ストレプトアビジンは20ug/mlになるようにPBSに溶かし、基質ペプチドの場合と同様の手順で感作プレートを作製した。

【0041】

(3) 測定手順

液相解析系（図1参照）

合成された基質ペプチドと組み換えアセチル基転移酵素を液相で反応させた後、その酵素活性をマイクロタイタープレート使用したELISA系で測定した。アセチル化バッファー(50mM Tris-HCl pH8.0, 10% グリセロール, 1mM DTT, 1mM PMS F, 10mM 酪酸ナトリウム, 200nM アセチルCoA) にそれぞれの基質ペプチドを1.0 ug/ml、組み換えアセチル基転移酵を0~10ug/mlで添加、混合し30℃、1時間反応させた。一反応は50ulでマイクロタイタープレートを用いて行った（アセチル基転移酵素反応）。反応後、各サンプルをマルチチャンネルピペットを用いて（

以下、添加の各ステップではマルチチャンネルピペットを使用した)、ストレプトアビジン感作プレートに移し、30℃、30分間インキュベートすることによって、基質ペプチドを、そのアミノ末端に導入しておいたビオチンを介してストレプトアビジン感作プレートに結合させた。インキュベート後、各ウェルを洗浄用バッファー(0.1% Tween 20, PBS)で4回以上十分に洗浄した。それぞれの基質ペプチドに対応する抗アセチル化ペプチド特異化抗体を 0.5ug/ml なるよう抗体希釈用緩衝液で希釈し、洗浄後の各ウェルに100ulずつ添加し、30℃、1時間静置した(一次反応)。一次反応後、同様に洗浄用バッファーで洗浄し、抗体希釈用バッファーで3000倍に希釈したヤギ抗ウサギ Ig (H+L) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識(MBL社製)を各ウェルに100ulずつ添加し、さらに30℃、1時間静置した(二次反応)。洗浄用バッファーで洗浄後、各ウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ基質液を100ulずつ添加し、30℃、30分間発色させた。1.5Nリン酸溶液を100ulずつ加え発色反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450nmにおける吸光度を測定した。

【0042】

固相解析系(図2参照)

基質ペプチド及び組み換えタンパクGST-p53 Cterを固相化しておいたウェル中でアセチル基転移酵素反応した後、同じウェルで連続してELISAを行った(基本的に一次反応以降は液相解析系と同様の操作手順である)。アセチル化バッファーにそれぞれの組み換えアセチル基転移酵素を0~10ug/mlになるよう加え、50ulずつ基質ペプチド及び「GST-p53 Cter」感作プレートプレートに添加した(アセチル基転移酵素反応)。30℃、1時間反応させた後、各ウェルを洗浄用バッファーで4回以上十分に洗浄した。それぞれの基質ペプチドに対応する抗アセチル化ペプチド特異化抗体を0.5ug/mlなるよう抗体希釈用バッファーで希釈し、洗浄後の各ウェルに100ulずつ添加して30℃で1時間静置した(一次反応)。一次反応後、同様に洗浄用バッファーで洗浄し、抗体希釈用バッファーで2000倍に希釈したヤギ抗ウサギ Ig (H+L)西洋ワサビペルオキシダーゼ標識(MBL社製)を各ウェルに100ulずつ添加し、さらに30℃で1時間静置した(二次反応)。洗浄用バッファーで洗浄後、各ウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ基質液を100ulずつ添加し、3

0℃で30分発色させた。1.5Nリン酸溶液を100ulづつ加え発色反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450nmにおける吸光度を測定した。

【0043】

(4) 測定結果

このELISA法を用いて、組み換えCBPのアセチル基転移酵素活性を測定した結果を示した(図9、図10)。大腸菌より精製された組み換えCBPは0~10ug/mlで添加した。「sub p53-1」及び「sub p53-2」ペプチド(液相)、もしくは、それらペプチド感作プレート(固相)を用いた。その結果、液相、固相において、CBPの濃度に応じた「sub p53-1」及び「sub p53-2」ペプチドへのアセチル基転移酵素活性が検出された。

【0044】

[実施例4] 脱アセチル酵素の活性測定系

1. 脱アセチル酵素活性測定用ELISA系の構築(基本的操作の大部分はアセチル基転移酵素活性測定用ELISA系と同様のものである)

(1) 基質ペプチド作製

ヒトp53のアミノ酸373番目と382番目のリジン残基のε-アミノ基にアセチル基を導入した2つの基質ペプチド「Sub Ac p53-1」(配列番号: 17/Bio-STSRHKK(Ac)LMFKTE)および「Sub Ac p53-2」(配列番号: 18/Bio-SHLKSKK(Ac)GQSTSR)を、ペプチド合成機を用いて作製した。なお、ペプチド中のアミノ酸は一文記号で示した。また、アミノ末端の「Bio」はビオチンを示す。また、K(Ac)はアセチル化リジン残基を示す。合成したペプチドは90%以上の純度であることがHPLCにより確認された。「Sub Ac p53-1」はヒトp53の376番目から388番目までの、「Sub Ac p53-2」は367番目から379番目までのアミノ酸からなる。

【0045】

(2) 基質ペプチド感作プレートの作製

2つの基質ペプチドをそれぞれ10ug/mlになるようにPBSに溶かした。それぞれのペプチド溶液をELISA用マイクロタイタープレート1ウェルあたり50ulづつ分注して、4℃、0/N、感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、1%BSA-0.1%Tween20-PBSを1wellあたり200ulづつ分注して、30℃、1時間以上ブロッキングをおこな

った。

【0046】

(3) 測定手順

液相解析系 (図3参照)

合成された基質ペプチドと組み換え脱アセチル化酵素を液相で反応させた後、その酵素活性をマイクロタイタープレート使用したELISAで測定した。脱アセチル化バッファー(10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 150mM NaCl) にそれぞれの基質ペプチドを1.0ug/ml、組み換え脱アセチル化酵素を0~10ug/mlで添加、混合し37℃で1時間反応させた。一反応は50ulでマイクロタイタープレートで行った(脱アセチル化酵素反応)。反応後、各サンプルをマルチチャンネルピペットを用いて(以下、添加の各ステップではマルチチャンネルピペットを使用した)、ストレプトアビジン感作プレートに移し30℃で30分インキュベートすることによって、基質ペプチドを、そのアミノ末端に導入しておいたビオチンを介してストレプトアビジン感作プレートに結合させた。インキュベート後、各ウェルを洗浄用バッファー(0.1% Tween20, PBS)で4回以上十分に洗浄した。それぞれの基質ペプチドに対応する抗アセチル化ペプチド特異化抗体を0.5ug/mlなるよう抗体希釈用バッファーで希釈し、洗浄後の各ウェルに100ulずつ添加し、30℃で1時間静置した(一次反応)。一次反応後、同様に洗浄用バッファーで洗浄し、抗体希釈用バッファーで2000倍に希釈したヤギ抗ウサギIg (H+L) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識 (MBL社製)を各ウェルに100ulずつ添加し、さらに30℃で1時間静置した(二次反応)。洗浄用バッファーで洗浄後、各ウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ基質液を100ulずつ添加し、30℃で30分発色させた。1.5Nリン酸溶液を100ulずつ加え発色反応を停止させた。マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450nmにおける吸光度を測定した。

【0047】

固相解析系 (図4参照)

基質ペプチドを固相化したウェル中で脱アセチル化酵素反応した後、同じウェルで連続してELISAを行った(基本的に一次反応以降は液相解析と同様の操作手順である)。脱アセチル化にそれぞれの組み換え脱アセチル化酵素を0~10ug/mlで加

え、50ulづつ基質ペプチド感作プレートプレートに添加した（脱アセチル酵素反応）。30℃、1時間反応させた後、各ウェルを洗浄用バッファーで4回以上十分に洗浄した。それぞれの基質ペプチドに対応する抗アセチル化ペプチド特異化抗体を0.5ug/mlなるよう抗体希釈用バッファーで希釈し、洗浄後の各ウェルに100ulづつ添加して30℃で1時間静置した（一次反応）。一次反応後、同様に洗浄用バッファーで洗浄し、抗体希釈用バッファーで2000倍に希釈したヤギ抗ウサギ Ig (H+L) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識（MBL社製）を各ウェルに100ulづつ添加し、さらに30℃で1時間静置した（二次反応）。洗浄用バッファーで洗浄後、各ウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ基質液を100ulづつ添加し、30℃で30分発色させた。1.5Nリン酸溶液を100ulづつ加え発色反応を停止させた。マイクロタータープレートリーダーを用いて、450nmにおける吸光度を測定した。

【0048】

(4) 測定結果

このELISA法を用いて、組み換えHDAC1の脱Ac化酵素活性を測定した結果を示した（図11、図12）。大腸菌より精製された組み換えHDAC1は0~10 ug/mlで添加した。「sub Ac p53-1」及び「sub Ac p53-2」ペプチド（液相）、もしくは、それらペプチド感作プレート（固相）を用いた。その結果、液相、固相において、HDAC1の濃度に応じた「sub Ac p53-1」及び「sub Ac p53-2」ペプチドの脱アセチル化酵素活性が検出された。

【0049】

【発明の効果】

本発明により、抗アセチル化ペプチド抗体を利用した、アセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出方法、アセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の阻害剤のスクリーニング方法、並びにこれら検出およびスクリーニングのためのキットが提供された。

【0050】

従来のアセチル基転移酵素活性の検出方法では、酵素反応後、活性測定のため、サンプルを一つずつフィルターにのせ、洗浄する必要がある、また従来の脱アセチル化酵素活性の検出方法では反応液中の遊離したアセチル基を分離、抽出す

る必要があった。一方、本発明のアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出方法は、酵素反応と活性測定を同一ウェル上で連続して行うことができるため、従来の方法に比して非常に簡便である。また、96穴マルチタイタープレートを用いることが可能であり、市販されている機器類を用いることができるため、サンプルや抗体の添加、洗浄、測定などを全て自動化できる点でも優れている。

【0051】

【配列表】

- (1) 出願人氏名又は名称：株式会社 医学生物学研究所
- (2) 発明の名称：アセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の活性検出方法、並びにこれら酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニング方法
- (3) 整理番号：M3-001
- (4) 出願番号：
- (5) 出願日：
- (6) 配列の数：18

配列番号：1

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

特徴を表す記号：modified site

存在位置：7

特徴を決定した方法：P

配列

Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Cys

1

5

10

配列番号：2

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Cys

1

5

10

配列番号 : 3

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴

特徴を表す記号 : modified site

存在位置 : 7

特徴を決定した方法 : P

配列

Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg Cys

1

5

10

配列番号 : 4

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg Cys

1

5

10

配列番号 : 5

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGGATCCC AGAATAGGTA TCATTTCTGT GAG

33

配列番号：6

配列の長さ：3 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGACTCGAGC TTGCACTCGT TGCAGGTGTA GAC

33

配列番号：7

配列の長さ：3 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TATGGATCCA TGCTGGAGGA GGAGATCTAT G

31

配列番号：8

配列の長さ：3 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TATCTCGAGC TTGTCAATGA GGCCTCCCTC C

31

配列番号 : 9

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CGCGGATCCA TGGCGCAGAC GCAGGGCACC

30

配列番号 : 10

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CGCCTCGAGG GCCAACTTGA CCTCCTCCTT

30

配列番号 : 11

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CGCGGATCCA TGGCCAAGAC CGTGGCGTAT

30

配列番号 : 12

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CGCCTCGAGA ATCTCCACAT CGCTTTCCTT

30

配列番号 : 13

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu

1

5

10

配列番号 : 14

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg

1

5

10

配列番号 : 15

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TATGGATCCA AGAGGAAGAG AATCTCCGC

29

配列番号 : 16

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TATCTCGAGG TCTGAGTCAG GCCCTTCTGA

30

配列番号 : 17

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴

特徴を表す記号 : modified site

存在位置 : 7

特徴を決定した方法 : P

配列

Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu

1

5

10

配列番号：18

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

特徴を表す記号：modified site

存在位置：7

特徴を決定した方法：P

配列

Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】

抗アセチル化ペプチド抗体を用いたアセチル基転移酵素活性の液相解析系の手法（一例）を示す図である。

【図2】

抗アセチル化ペプチド抗体を用いたアセチル基転移酵素活性の固相解析系の手法（一例）を示す図である。

【図3】

抗アセチル化ペプチド抗体を用いた脱アセチル化酵素活性の液相解析系の手法（一例）を示す図である。

【図4】

抗アセチル化ペプチド抗体を用いた脱アセチル化酵素活性の固相解析系の手法（一例）を示す図である。

【図5】

抗Ac p53-1抗体の特異性を示す図である。

【図 6】

抗Ac p53-2抗体の特異性を示す図である。

【図 7】

抗Ac p53-1抗体の競合阻害解析の結果を示す図である。

【図 8】

抗Ac p53-2抗体の競合阻害解析の結果を示す図である。

【図 9】

CBPのsub p53-1に対するアセチル基転移酵素活性を示す図である。

【図 10】

CBPのsub p53-2に対するアセチル基転移酵素活性を示す図である。

【図 11】

HDAC1のsub Ac p53-1に対する脱アセチル化酵素活性を示す図である。

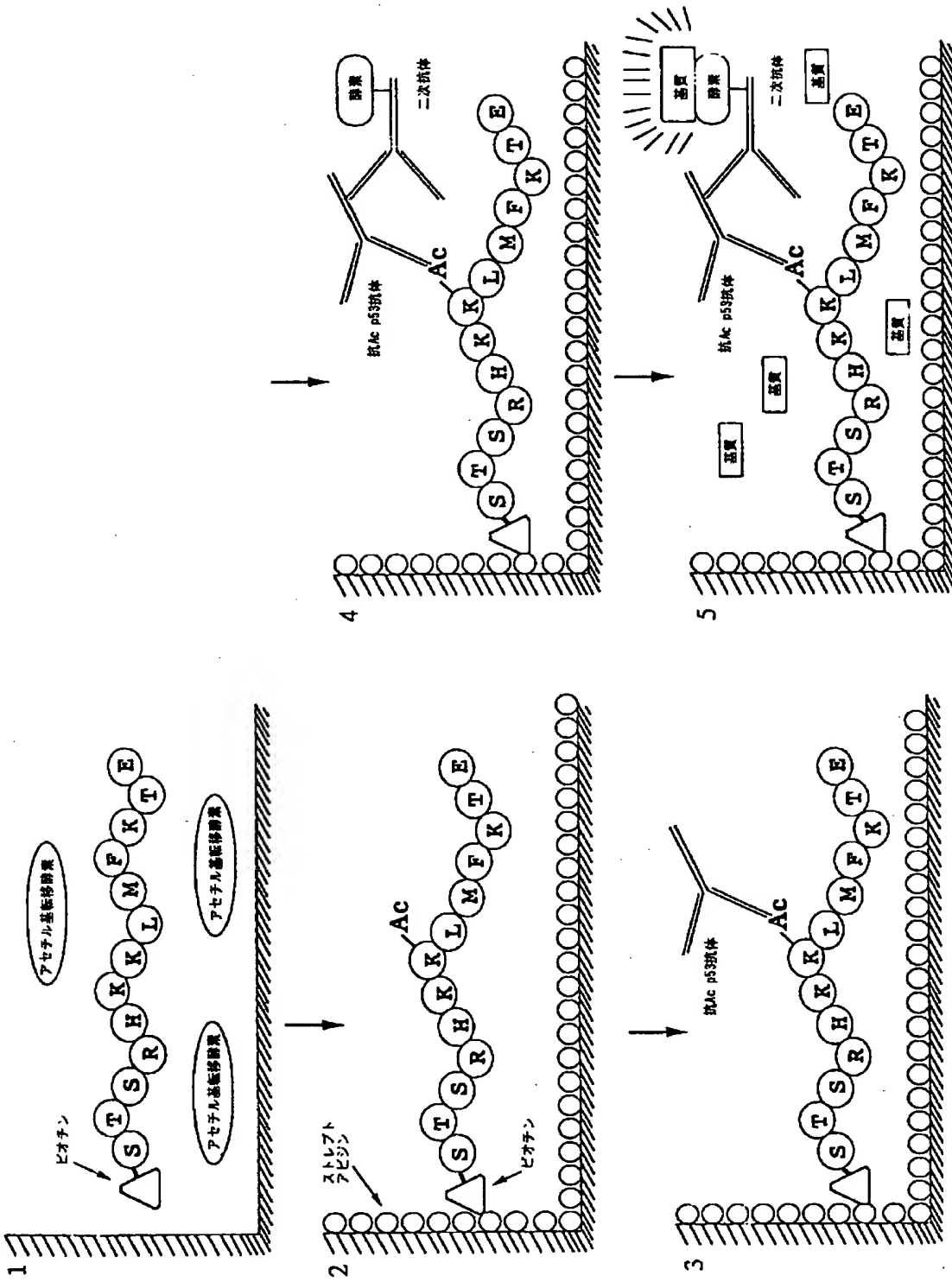
【図 12】

HDAC1のsub Ac p53-2に対する脱アセチル化酵素活性を示す図である。

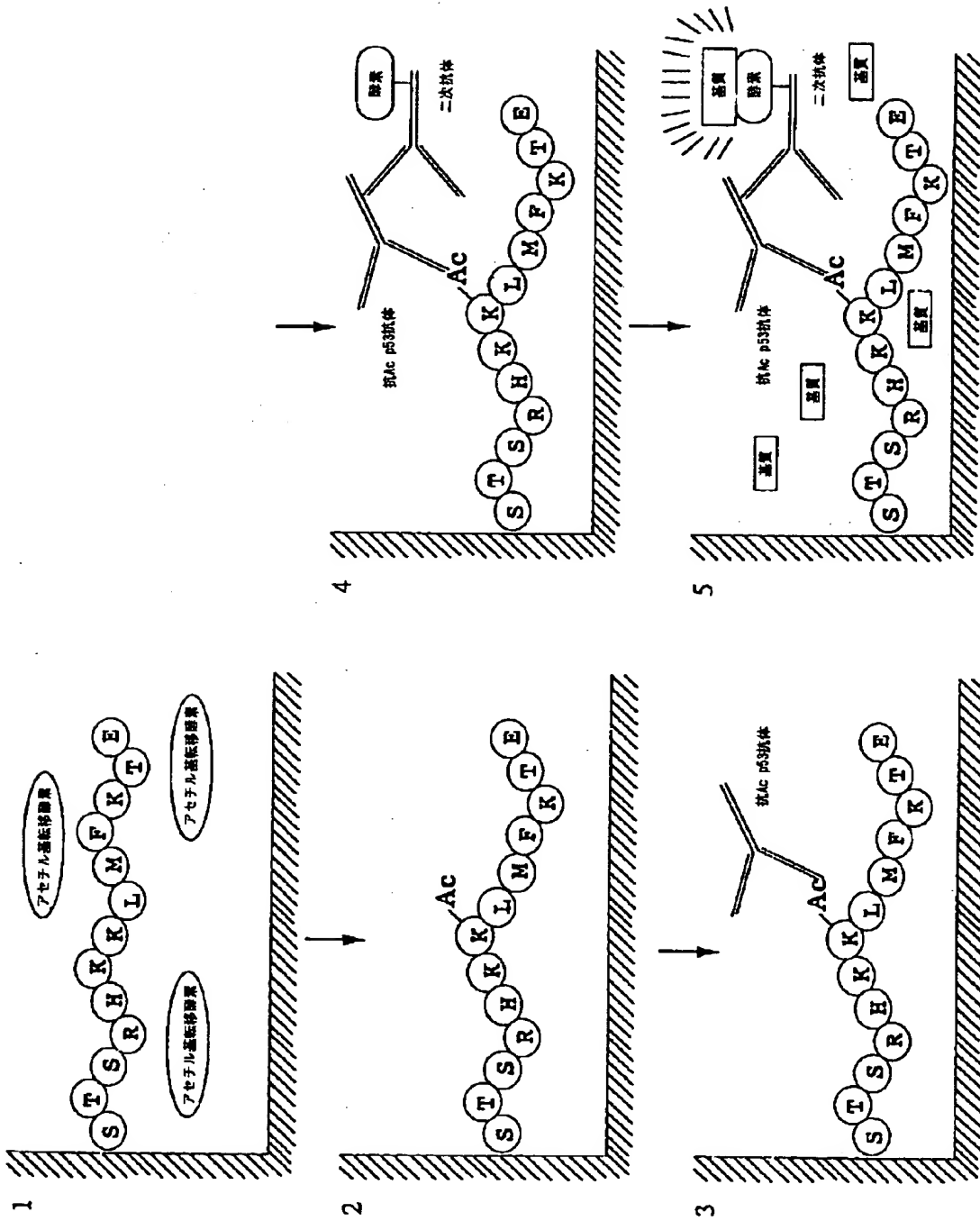
【書類名】

図面

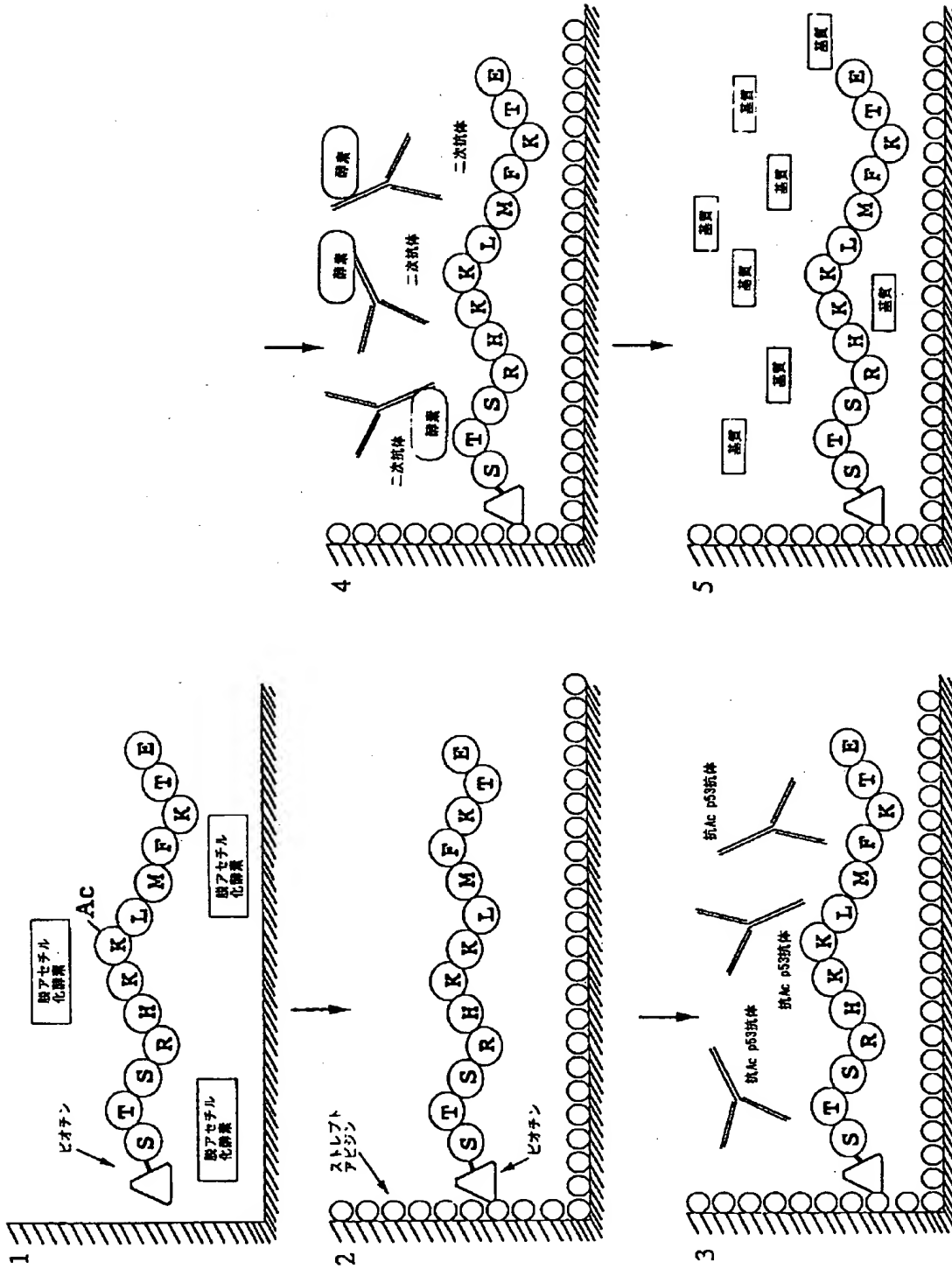
【図 1】



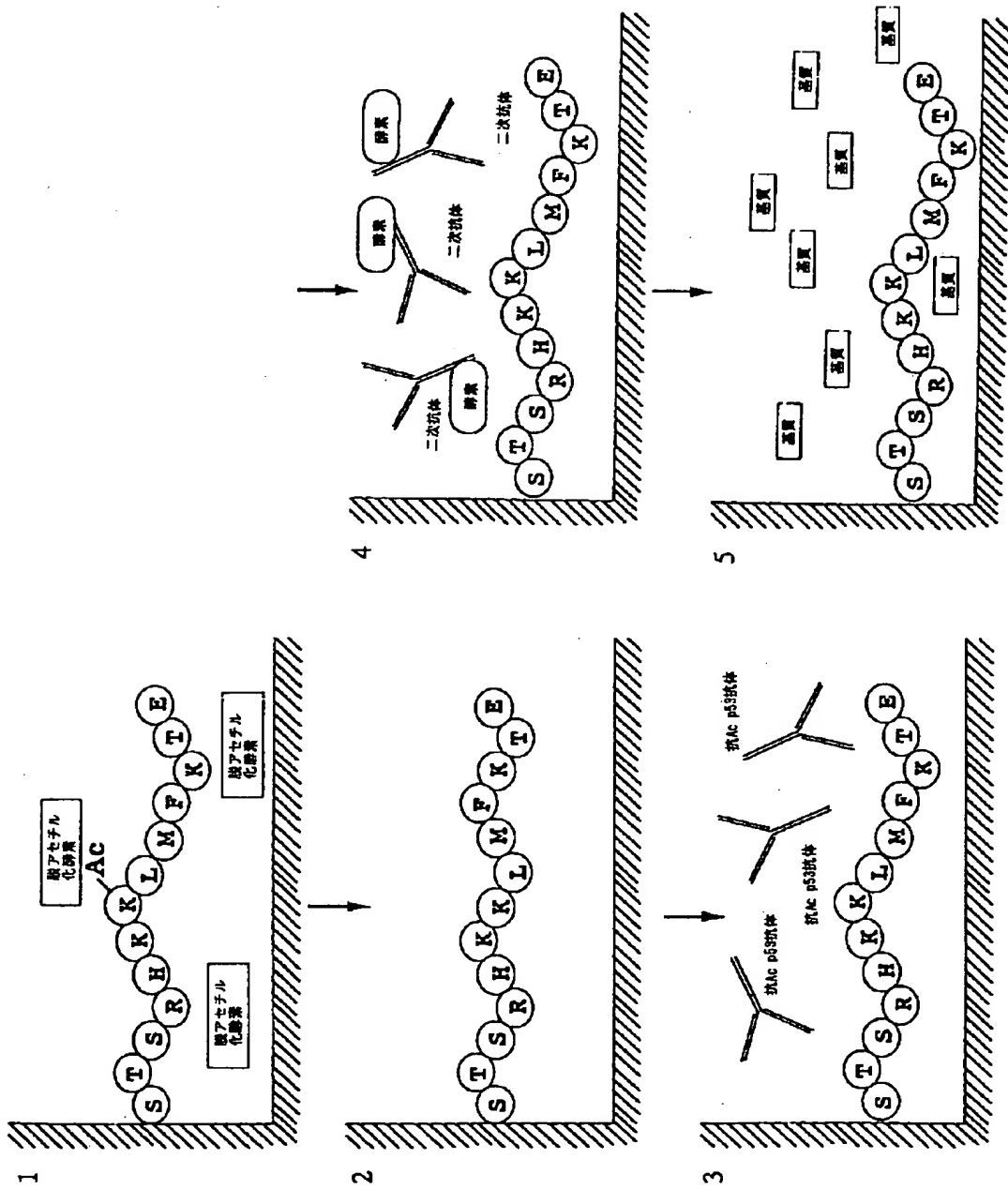
【図 2】



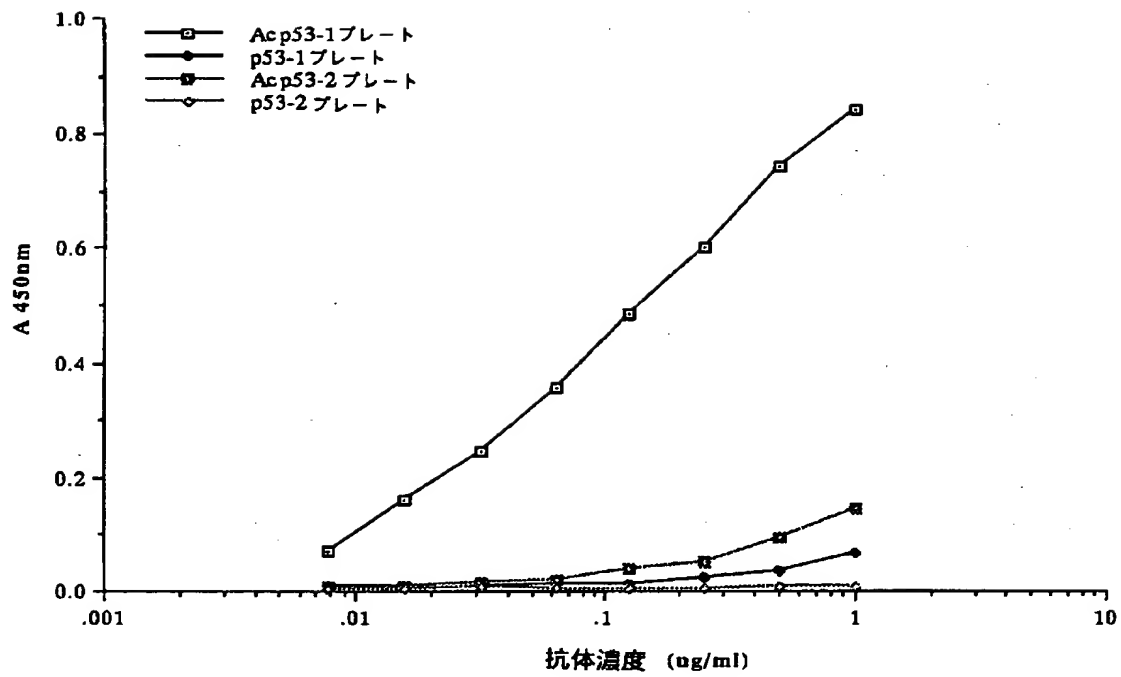
【図 3】



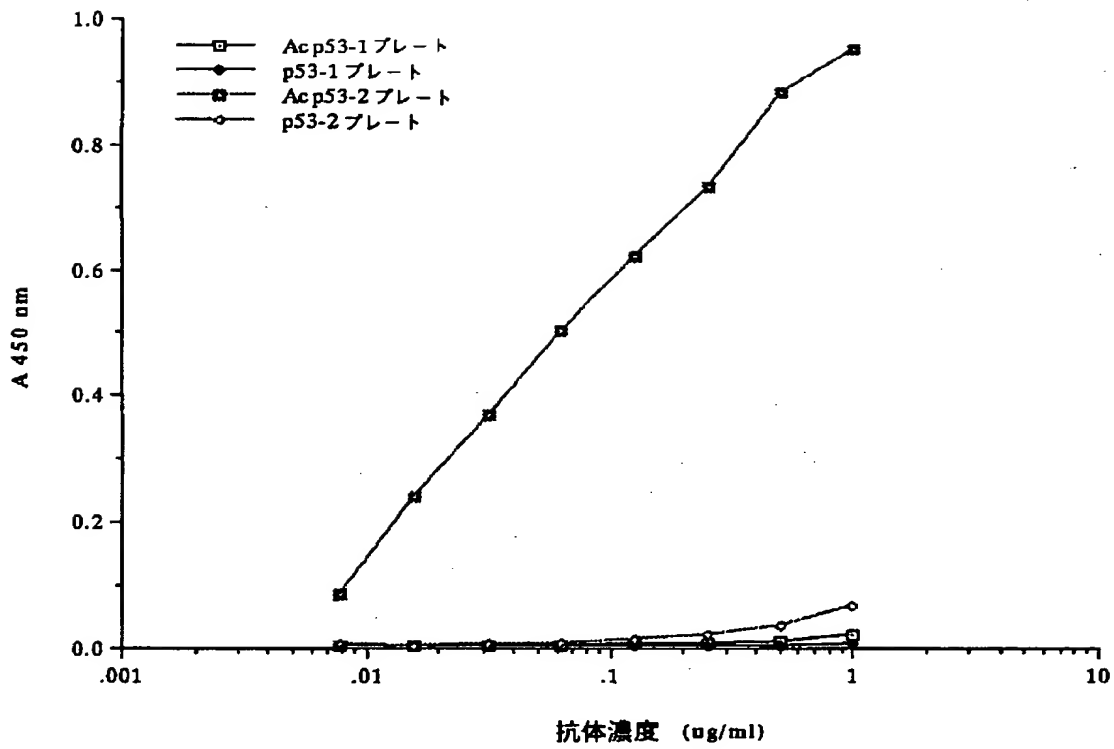
【図 4】



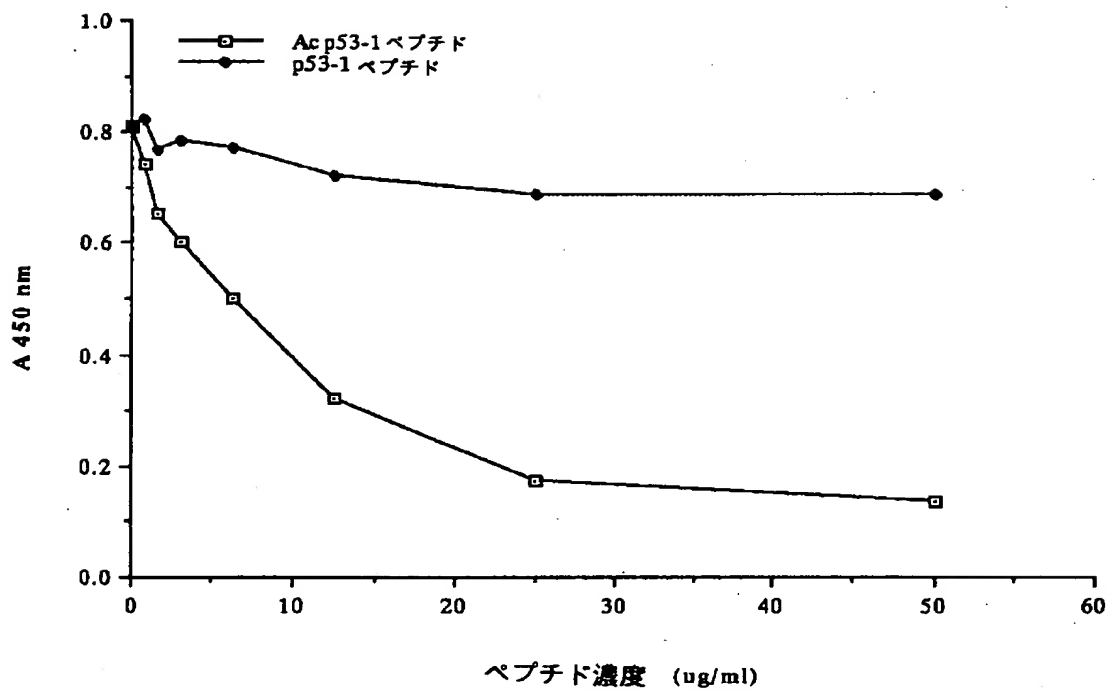
【図 5】



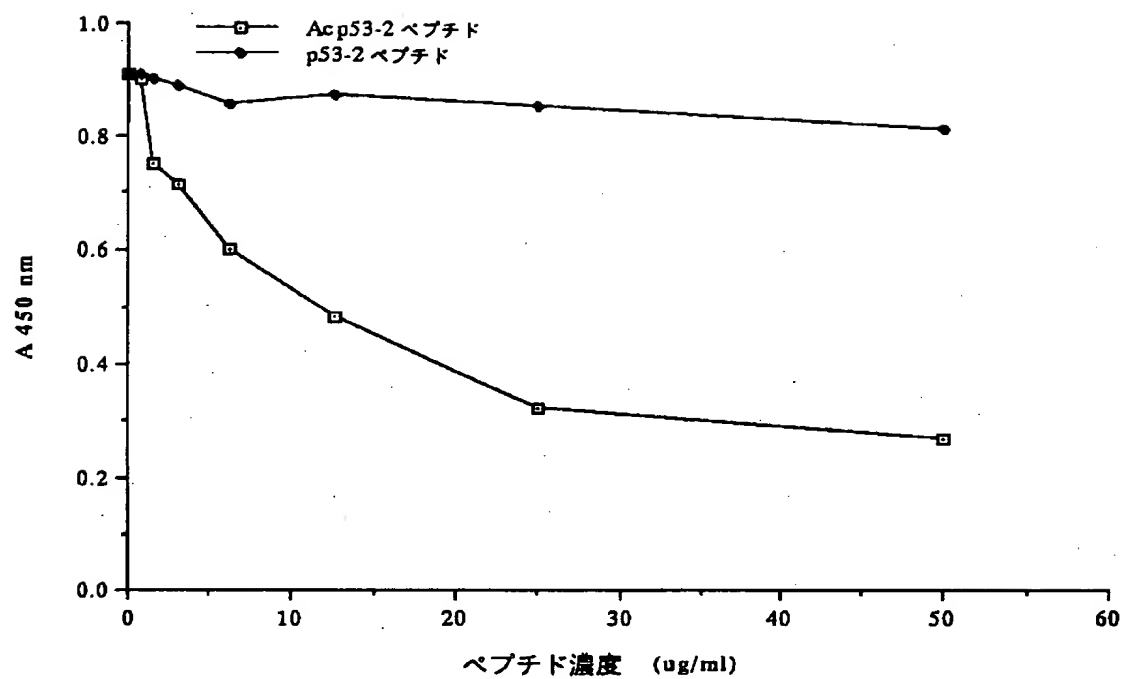
【図 6】



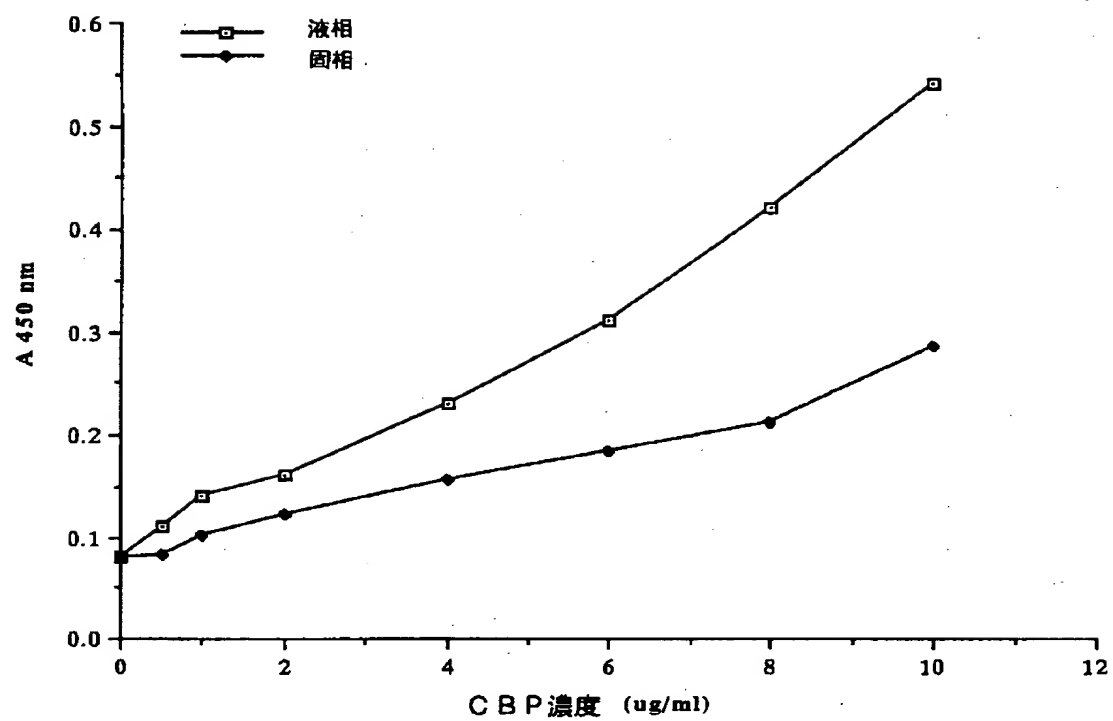
【図7】



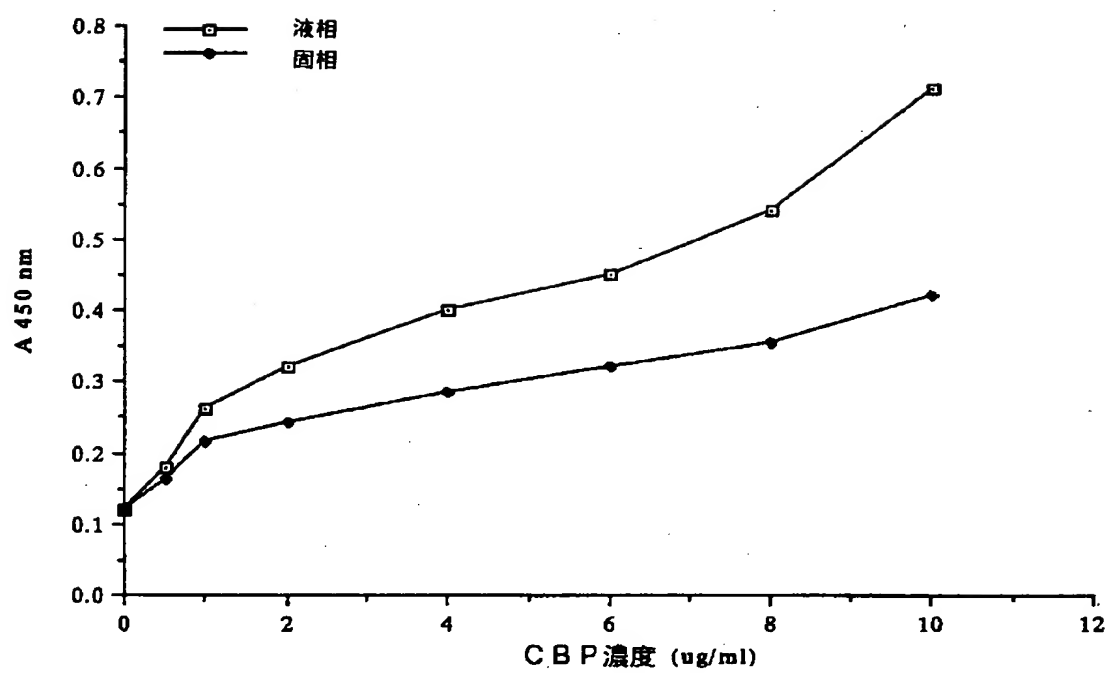
【図8】



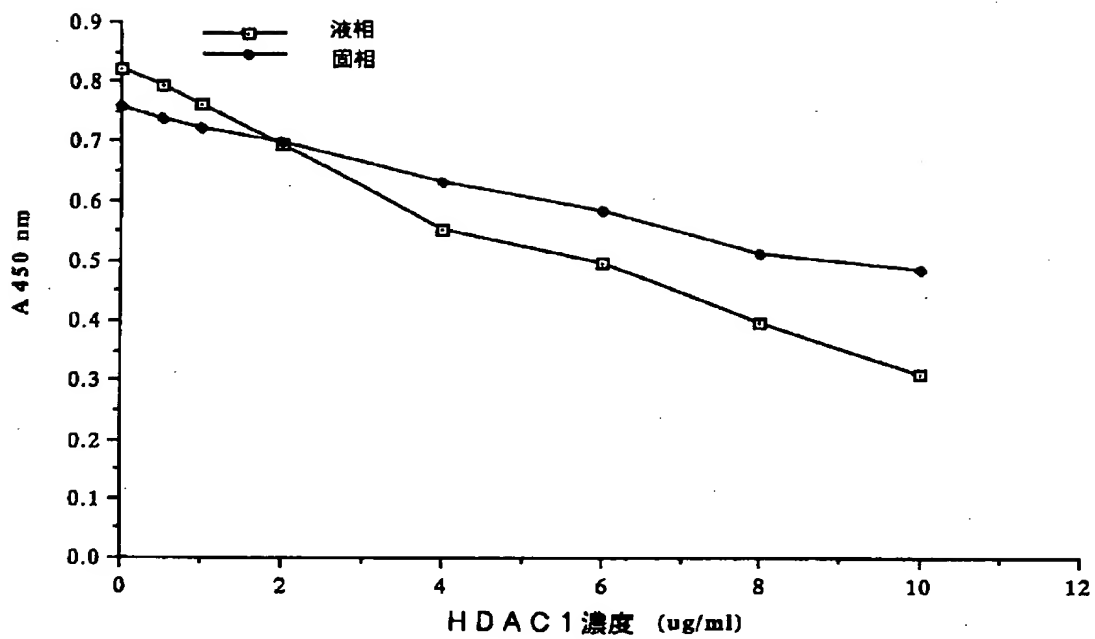
【図 9】



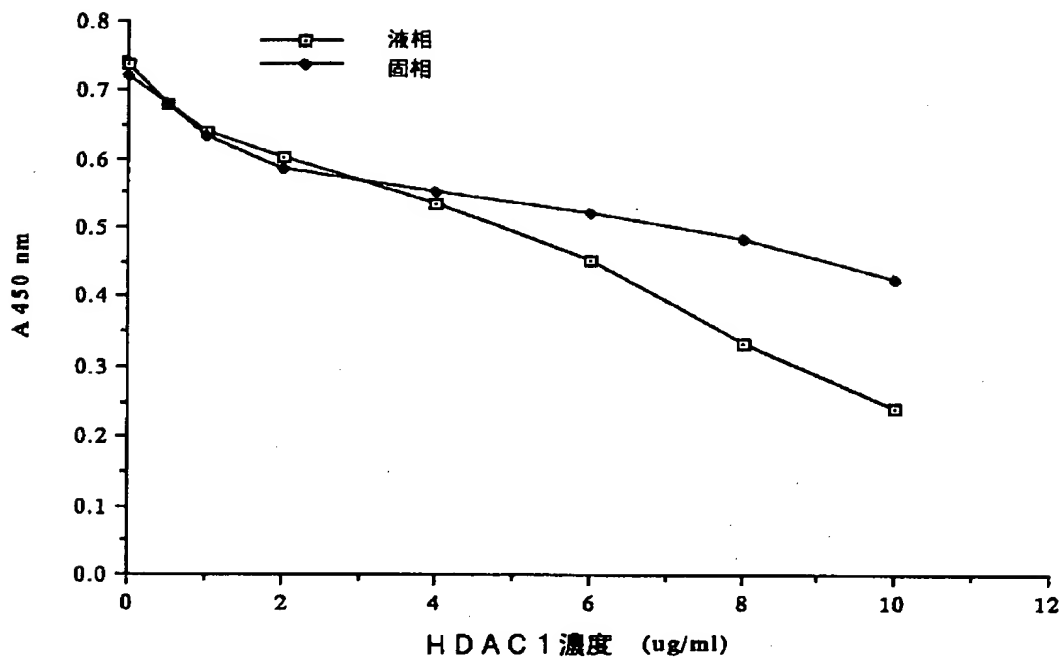
【図 10】



【図 11】



【図12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便にアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性を検出する方法、簡便にアセチル基転移酵素および脱アセチル化酵素の阻害剤もしくは促進剤をスクリーニングする方法、並びにこれら検出およびスクリーニングのためのキットを提供することを課題とする。

【解決手段】 抗アセチル化ペプチド抗体を調製し、アセチル基転移酵素による基質ペプチドのアセチル化反応、および脱アセチル化酵素によるアセチル化された基質ペプチドの脱アセチル化反応を行って、これらの反応後に基質ペプチドに結合しているアセチル基の検出を行った結果、抗アセチル化ペプチド抗体を用いることにより簡便にタンパク質のアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性を検出することができることを見出した。さらに、この抗アセチル化ペプチド抗体を用いたアセチル基転移酵素活性および脱アセチル化酵素活性の検出系を利用することにより、簡便にアセチル基転移酵素及び脱アセチル化酵素に対する阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 390004097

【住所又は居所】 愛知県名古屋市長区鳴海町字四本木 16-3

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成10年 2月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 平成10年特許願第 9171号

【補正をする者】

 【事件との関係】 特許出願人

 【識別番号】 390004097

 【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

 【補正対象書類名】 特許願

 【補正対象項目名】 提出物件の目録

 【補正方法】 追加

 【補正の内容】

 【提出物件の目録】

 【物件名】 委任状 1

29803200111



委任状

平成 10年 2月 2日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志

識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲

を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特許出願、特許権の存続期間の延長登録の出願、実用新案登録出願、意匠登録出願、商標（防護標章）登録出願及び商標権（防護標章登録に基づく権利）存続期間更新登録出願に関する手続
1. 上記出願に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は中立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 国内優先権主張の先の出願である
に基づく特許法第41条第1項または実用新案法第8条第1項の優先権の主張及びその取下げ
1. 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所又は居所

氏名又は名称

代表者

名古屋市中区立の内3丁目5番10号

住友商事丸の内ビル5F

株式会社 医学 生物学 研究所

代表取締役社長 数 納 幸 子



【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】
【識別番号】 390004097
【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区鳴海町字四本木 16-3
【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390004097]

1. 変更年月日 1990年 8月31日
[変更理由] 新規登録
住 所 愛知県名古屋市緑区鳴海町字四本木16-3
氏 名 株式会社医学生物学研究所
2. 変更年月日 1998年 7月22日
[変更理由] 住所変更
住 所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内
ビル5F
氏 名 株式会社医学生物学研究所